

ZUR CHROMATOGRAPHIE VON
SCHILDDRÜSENHORMONEN

GERT VON PATTAY

1972



8 München 23
Clemensstraße 27
Telefon 342149

AUS DER II. MEDIZINISCHEN KLINIK DER UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Komm.Direktor Prof.Dr.M.M.Forell

ZUR CHROMATOGRAPHIE VON SCHILDDRÜSENHORMONEN

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten
Medizin verfaßt und
einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Gert von P a t t a y
aus München
1971

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Priv.Doiz.Dr.P.C.SCRIBA

Mitberichterstatter: Prof.Dr.M.M.FORELL

Dekan: Prof.Dr. W. SPANN

Tag der Mündlichen Prüfung: 18.1.1972



Inhaltsverzeichnis

	Seite
I. EINLEITUNG	1
II. GESAMTHORMONJODBESTIMMUNG IN JODVERSEUCHTEN SEREN	2
1. Methodik	2
1.1 Präparieren der Säulen	2
1.2 Inkubationsgemisch von T_4 - ^{125}J und T_3 - ^{125}J mit Serum	2
1.3 Auftragen der Proben	2
1.4 Verwendete Elutionsmittel	3
1.5 Verwendete jodhaltige Kontrastmittel und Medikamente	3
1.6 Sammeln der Eluate, Messung der Radioaktivität	3
1.7 Chemischer Jodnachweis	3
1.8 Einengen der Eluate	3
2. Versuchsdurchführung und Ergebnisse	3
3. Zusammenfassung und Diskussion	4
III. VERSUCHE ZUR TRENNUNG VON TRIJODTHYRONIN UND THYROXIN AUF SEPHADEX G-25 FINE	9
1. Methodik	9
2. Versuchsdurchführung und Ergebnisse	9
2.1 Einfluss von Molarität und Wasserstoffionenkonzentration eines Tris-HCl-Puffers auf die Trennung von T_3 - ^{125}J und T_4 - ^{125}J	9
2.2 Einfluss verschiedener Pufferlösungen auf die Trennung von T_3 und T_4	11
3. Zusammenfassung und Diskussion der Ergebnisse	13
IV. DÜNNSCHICHTCHROMATOGRAPHISCHE TRENNUNG VON TRIJODTHYRONIN UND THYROXIN	14
1. Technisches Vorgehen	14
1.1 Beschichten der Platten	14

1.2 Auftragen der Substanzen	14
1.3 Entwickeln der Platten	14
1.4 Chemischer Nachweis der "kalten" Substanzen	15
1.5 Messung radioaktiver Substanzen	15
1.6 Auswertung	17
1.7 Fehlerquellen	17
2. Ergebnisse der dünnsschichtchromatogra- phischen Trennung von T_3 und T_4	18
2.1 Auftrennung "kalter" Standards	18
2.2 Auftrennung radioaktiver Standards	23
3. Zusammenfassung und Diskussion der Ergebnisse	24
V. ZUSAMMENFASSUNG	25
VI. LITERATURVERZEICHNIS	26

I. EINLEITUNG

Zur Überprüfung der Schilddrüsenfunktion haben sich die Bestimmung des proteingebundenen Jods (PB^{127}I) und der T_3 -in vitro-Test als routinemässige Laboratoriumsmethoden seit langem bewährt. Bei weniger als 5 % der Hyperthyreosen findet sich kein erhöhtes PB^{127}I oder keine Erhöhung des sog. freien T_3 - ^{125}J . Beide Methoden sind aber durch verschiedene Störfaktoren belastet (1,2). In einer früheren Dissertation (1) wurde festgestellt, dass nur etwa 40 % aller erhöhten PB^{127}I -Werte einer Hyperthyreose entsprechen. Der Rest war durch jodhaltige Medikamente, Röntgen-Kontrastmittel oder unbekannte Ursachen erhöht. Aus diesem Grunde wurde versucht, eine Methode zu finden, um verschiedene störende jodhaltige Verbindungen aus dem Patientenserum zu entfernen. Neben dieser Fragestellung war es Aufgabe dieser Arbeit, chromatographische Systeme zu erproben, die eine Trennung von Trijodthyronin und Thyroxin erlauben. Die getrennte Bestimmung von Trijodthyronin und Thyroxin im Serum ist wünschenswert, da Trijodthyronin biologisch wirksamer ist als Thyroxin. Normalerweise finden sich Thyroxin und Trijodthyronin etwa in einem Verhältnis von 30:1. Man muss jedoch mit disproportionierten Veränderungen der Thyroxin- bzw. Trijodthyroninspiegel rechnen, welche mit den üblichen Methoden der PB^{127}I -Bestimmung und des T_3 -in vitro-Testes nicht zu erfassen sind.

II. GESAMTHORMONJODBESTIMMUNG IN JODVERSEUCHTEN SEREN

1. Methodik

1.1 Präparieren der Säulen

Es wurden temperierbare Glassäulen mit einem Durchmesser von 12 mm und einer Höhe von 25 cm verwendet. Vor die Ausflussskapillare wurde eine Schicht Glaswolle (ca. 0,5 cm) gepresst und darüber eine ca. 1 cm hohe Schicht Glasperlen ($d=1$ mm) gegeben. Bei verschlossener Ausflussskapillare wurde das in Aqua dest. gequollene Sephadex G-25 fine bzw. Sephadex G-15 (Fa. Pharmacia, Uppsala/Schweden) eingefüllt. Nach Sedimentation des Gels wurde die Säule an ein Vorratsgefäß angeschlossen und mit einem Filtrationsdruck von ca. 1 m Wassersäule mit den verschiedenen Lösungen äquilibriert.

1.2 Inkubationsgemisch von T_4 - ^{125}J und T_3 - ^{125}J mit Serum. 0,2 mCi L-Trijodthyronin- ^{125}J bzw. L-Thyroxin- ^{125}J in ca. 1 ml 50 %iger wässriger Propylen-Glykol-Lösung, Trijodthyroningehalt 10-18 μg , Thyroxingehalt 10-18 μg (Radiochemical Centre, Amersham/England) wurden mit sterilem 0,06 M Natriumphosphatpuffer pH 7,4 auf ein Gesamtvolumen von 200 ml gebracht. Diese Lösung wurde bei +4 ° C bis zum Gebrauch aufbewahrt. Der Reinheitsgrad wurde papierchromatographisch überprüft (3). Falls nicht anders vermerkt, wurden 0,6 ml dieser Lösung mit 3 ml Serum im Schüttelbad bei 37 ° C für 15 min. inkubiert, was zur Äquilibrierung der T_3 - und T_4 -Bindung ausreicht (1). Von dem Gesamtvolumen wurde 1 ml zur Bestimmung der Gesamtaktivität und 1 ml zur Dextrangelfiltration verwandt.

1.3 Auftragen der Proben.

Nach Absaugen des über dem Gel stehenden Lösungsmittels wurde das jeweilige Inkubationsgemisch aufgetragen. Es ist zu vermeiden, die Oberfläche des Gels aufzuwirbeln. Nach dem Einsickern der Probe wurde zweimal mit je 1 ml des jeweiligen Elutionsmittels nachgewaschen und dabei die Säulenwand über dem Gelbett abgespült. Anschliessend wurde sofort ein Vorratsgefäß mit dem jeweils gewünschten Elutionsmittel an die Säule angeschlossen.

1.4 Verwendete Elutionsmittel.

0,015 N NaOH, 0,1 M Ammoniumcarbonatlösung, 2 N NH_3 in 30 % Äthanol, 2 N NH_3 in 20 % Äthanol, 0,1 M Ammoniumcarbonatlösung mit 25 % NH_3 auf pH 10 oder pH 8,9 gebracht, 5 % Ameisensäure, 0,1 M Ammoniumacetatlösung, 0,1 M Ammoniumcarbonatlösung in 10 % Äthanol oder in 30 % Äthanol, 10 % Ameisensäure, 0,1 M Natriumcarbonatlösung.

1.5 Verwendete jodhaltige Kontrastmittel und Medikamente

Biligradin forte (Fa.Schering, Berlin)

Urogradin (Fa.Schering, Berlin)

Mexaform S (Fa.Ciba, Basel)

1.6 Sammeln der Eluate, Messung der Radioaktivität.

Das Eluat wurde mit einem automatischen Fraktionssammler in 2 oder 4 ml-Fraktionen gesammelt, wenn nicht anders beschrieben. Die Proben wurden mit Hilfe eines Gammazählers (Gammaguard, Fa.Tracerlab/Köln) gemessen. Um die Messfehler möglichst gering zu halten, wurde die Messzeit jeweils so gross gewählt, dass eine genügend hohe Impulsrate (mindestens 10 000 Impulse/Zählzeit) gewährleistet war.

1.7 Chemischer Jodnachweis.

Das "kalte" Jod im Eluat wurde mittels saurer Veraschung mit Hilfe eines Autoanalyzers zur PB^{127}I -Bestimmung (Fa. Technicon, Frankfurt) nachgewiesen. Dazu war es allerdings nötig, das erhaltene Eluat einzuengen, um einerseits die Jodkonzentration zu erhöhen und andererseits die Bestimmung störende Chemikalien (z.B. Ameisensäure, Äthanol, etc.) auszuschalten.

1.8 Einengen der Eluate.

Das Einengen der Proben wurde in einem geschlossenen System unter Stickstoffatmosphäre vorgenommen (1).

2. Versuchsdurchführung und Ergebnisse.

4 g Sephadex G-25 fine bzw. Sephadex G-15 wurden mit 0,015 N NaOH äquilibriert. Dann wurde ein Gemisch von Biligradin forte

(0,001 g Jod/ml), 0,6 ml $T_3^{-125}J$ und 0,4 ml 0,5 N NaOH auf die Säule aufgetragen. Anschliessend wurde mit 80 ml 0,1 M Ammoniumcarbonatlösung und 50 ml 0,015 N NaOH eluiert. Das Eluat wurde zuerst im Gammazähler radioaktiv gemessen und anschliessend im Autoanalyser chemisch bestimmt (Screening zur Vermeidung einer Jodverseuchung des Gerätes).

Abb.1 und 2 zeigt, dass bei diesem Vorgehen keine vollständige Abtrennung des Kontrastmittels von den Schilddrüsenhormonen gelang. Bei der Chromatographie von Patientenserum, das nach intravenöser Verabreichung von Biligradin forte gewonnen wurde, fand sich das gleiche Ergebnis (Abb. 3 und 4). Durch Verlängerung des Zwischenspülschrittes von 80 ml auf 100 ml 0,1 M Ammoniumcarbonatlösung und Elution des Schilddrüsenhormons in einem schmäleren Peak mit 1 N Ammoniak in 30 % Äthanol konnte keine bessere Abtrennung des Kontrastmittels erreicht werden. Bei Erhöhung des pH-Wertes der 0,1 M Ammoniumcarbonatlösung auf pH 8,9 durch Zugabe von 25 %igem Ammoniak deutete sich allerdings auf Sephadex G-25 eine Trennung von $T_3^{-125}J$ und $T_4^{-125}J$ an (Abb.5 und 6). Auch durch Verwendung verschiedener anderer Zwischenspüllösungen und durch weitere Verlängerung des Zwischenspülschrittes bis auf 180 ml konnte keine vollständige Eliminierung des Biligradin forte aus dem Schilddrüsenhormonpeak erzielt werden. Folgende Elutionsmittel wurden verwendet: 80 ml 0,1 M Ammoniumcarbonatlösung, die mit 25 % NH_3 auf pH 10 gebracht wurde, 80 ml 0,1 M Ammoniumcarbonatlösung in 30 % Äthanol, 160 ml 0,1 M Ammoniumcarbonatlösung in 10 % Äthanol, 160 ml 0,1 M Natriumcarbonatlösung, 180 ml 5 % Ameisensäure. Auch bei Seren von Patienten nach Mexaform S- und Urogratin-Verabreichung liess sich durch die oben beschriebenen Verfahren keine ausreichende Eliminierung der "Jodverseuchung" erreichen.

3. Zusammenfassung und Diskussion.

Durch Chromatographie von jodverseuchten Seren über Sephadex G-15 oder G-25 fine gelang es zwar, Biligradin forte, Urogratin und Mexaform S zum grössten Teil von Trijodthyronin und Thyroxin abzutrennen. Eine vollständige Entfernung der

Abb.1: Chromatographie von T_3 - ^{125}J und Biligrafin forte auf 4 g Sephadex G-15. Ausbeute T_3 - ^{125}J 84 %. Radioaktivität ●—●—● . Stabiles Jod ▲—▲—▲

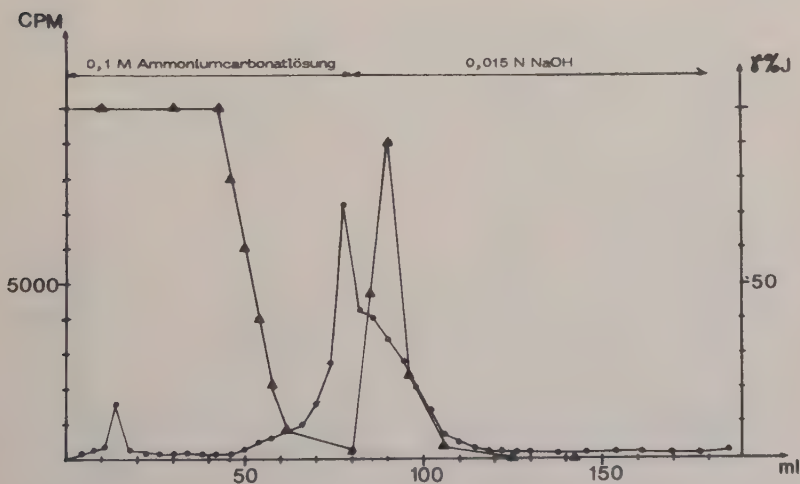
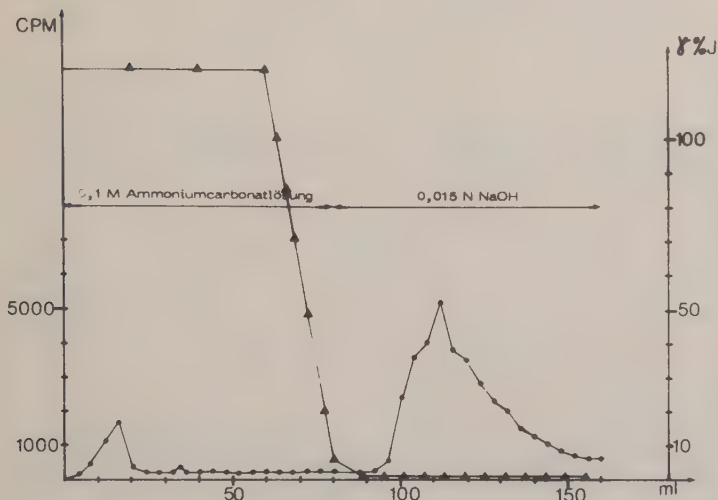


Abb.2: Chromatographie von T_3 - ^{125}J und Biligrafin forte auf 4 g Sephadex G-25 fine. Ausbeute T_3 - ^{125}J 79 %. Radioaktivität ●—●—● . Stabiles Jod ▲—▲—▲

Abb.3: Chromatographie von Patientenserum nach Injektion von Biligrafin forte inkubiert mit T_3 - ^{125}J auf 4 g Sephadex G-25 fine. Ausbeute T_3 - ^{125}J 100 %. Radioaktivität ●—● . Stabiles Jod ▲—▲

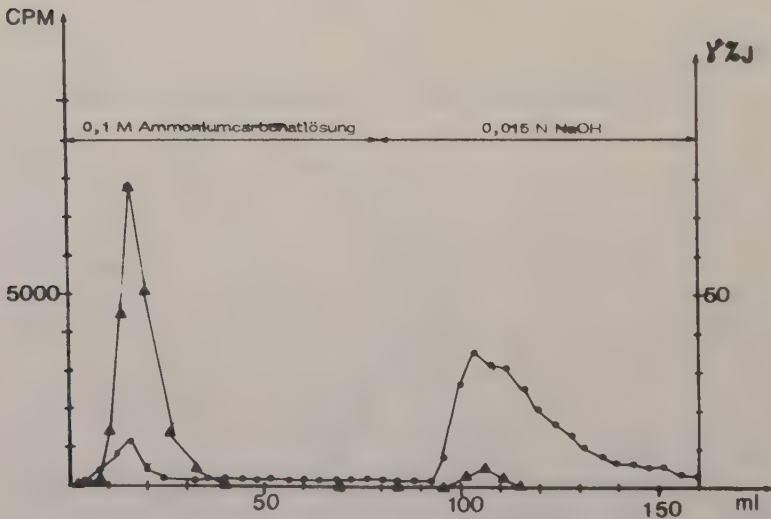
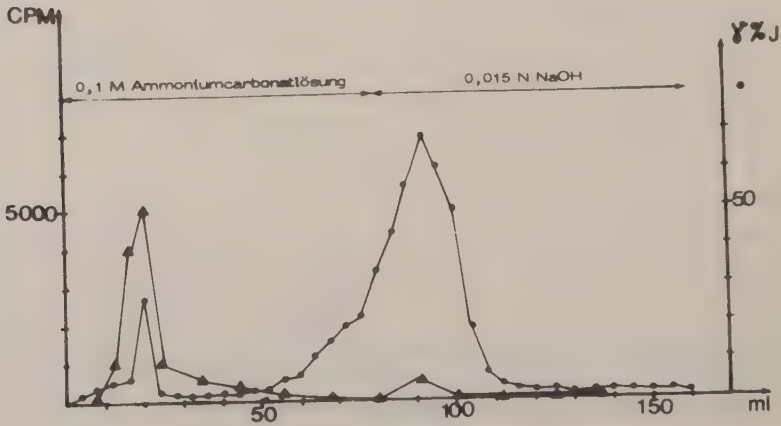


Abb.4: Chromatographie von Patientenserum nach Injektion von Biligrafin forte inkubiert mit T_3 - ^{125}J auf 4 g Sephadex G-15. Ausbeute T_3 - ^{125}J 74 %. Radioaktivität ●—● . Stabiles Jod ▲—▲

Abb.5: Chromatographie von Patientenserum nach Injektion von Biligrafin forte, inkubiert mit T_3 - ^{125}J und T_4 - ^{125}J , auf 4 g Sephadex G-25 fine. Wiederfinderate 110 %. Radioaktivität ●—● Stabiles Jod ▲—▲

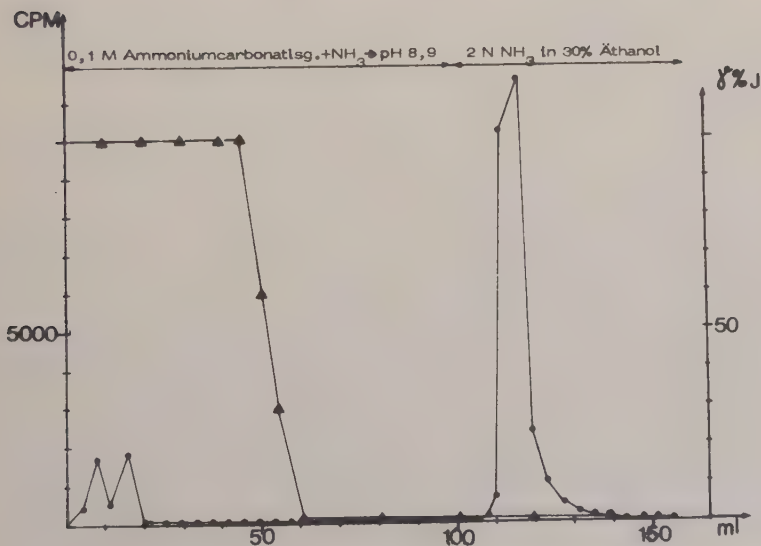
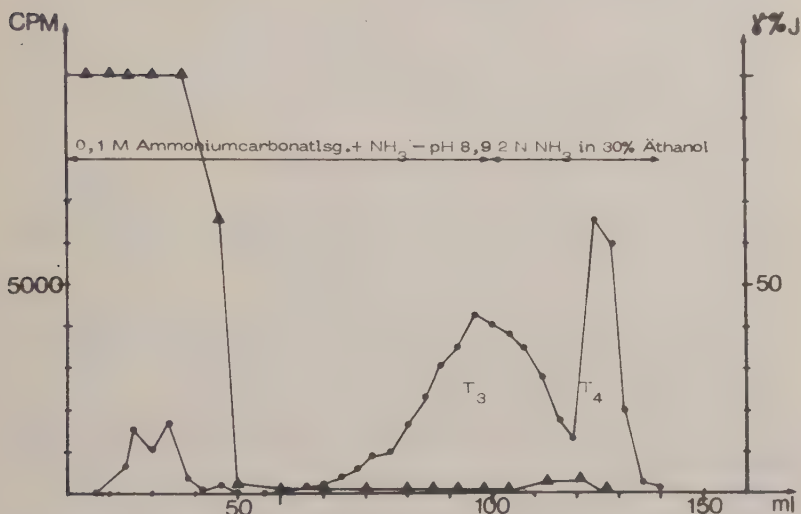


Abb.6: Chromatographie von "Biligrafin-verseuchtem Serum, inkubiert mit T_3 - ^{125}J und T_4 - ^{125}J , auf 4 g Sephadex G-15. Wiederfinderate 70 %. Radioaktivität ●—● Stabiles Jod ▲—▲

die PB^{127}I -Bestimmung störenden organischen Jodverbindungen war uns aber nicht möglich. Allerdings liegen diese im Serum in Konzentrationen vor, die ein Vielfaches (bis zu 10^4) der Schilddrüsenhormonjodkonzentration ausmachen. Somit war uns eine quantitative, chemische Gesamthormonjodbestimmung in jodverseuchten Seren auch nach Dextrangelfiltration nicht möglich. Allerdings erlaubt der Nachweis erhöhter Jodmengen im Protein-Gipfel den Schluss, dass Störsubstanzen vorliegen und der PB^{127}I -Wert verfälscht ist.

Wegen der Schwierigkeiten zur vollständigen Eliminierung der untersuchten organischen Jodverbindungen und in Anbetracht der grossen Zahl jodhaltiger Medikamente und Kontrastmittel (1), erschienen uns weitere Versuche zur Verbesserung dieser Methode wenig aussichtsreich. In diesen Fällen muss man zur Überprüfung der Schilddrüsenfunktion andere, von Jodverseuchung unabhängige Methoden heranziehen, wie z.B. den T_3 -in-vitro-Test oder die Gesamtthyroxinbestimmung nach MURPHY und PATTEE.

III. VERSUCHE ZUR TRENNUNG VON TRIJODTHYRONIN UND THYROXIN AUF SEPHADEX G-25 FINE.

Aus verschiedenen Arbeiten ist bekannt, dass Trijodthyronin und Thyroxin eine besondere Affinität zu Dextrangel zeigen (1,4,5,6). Besonders ausgeprägt ist dies der Fall bei den stark vernetzten Typen (Sephadex G-25, G-15 und G-10). Es erhob sich die Frage, ob mit geeigneten Elutionsmitteln Trijodthyronin und Thyroxin selektiv zu eluieren sind.

1. Methodik.

Präparation der Säulen, Inkubationsgemische von T_3 - ^{125}J und T_4 - ^{125}J , Sammeln und Messen der Eluate s. II, 1.

2. Versuchsdurchführung und Ergebnisse.

2.1 Einfluss von Molarität und Wasserstoffionenkonzentration eines Tris-HCl-Puffers auf die Trennung von T_3 - ^{125}J und T_4 - ^{125}J .

Wie bei II,1. beschrieben, wurden 5 g Sephadex G-25 mit 0,015 N NaOH äquilibriert. Aufgetragen wurde ein Inkubationsgemisch aus 0,5 ml T_3 - ^{125}J bzw. T_4 - ^{125}J und 2 ml 0,1 M Natriumphosphatpuffer pH 7,4. Bei der anschliessenden Elution mit nacheinander 40 ml 0,01 M Natriumphosphatpuffer pH 7,4, 50 ml 0,3 M Tris-HCl-Puffer pH 10,3 und 60 ml 0,015 N NaOH zeigte sich, dass Trijodthyronin langsam eluiert wird, während Thyroxin fest auf der Säule gebunden bleibt und erst mit 0,015 N NaOH eluiert wird (Abb.7). Bei Senkung des pH-Wertes des 0,3 M Tris-HCl-Puffers auf 8,2 wanderte das T_3 - ^{125}J noch langsamer. Bei Verwendung eines 10^{-3} M Tris-HCl-Puffers pH 8,2 ergab sich dasselbe Bild. Bei einer weiteren Senkung des pH-Wertes des Tris-HCl-Puffers auf pH 8,0 wurde T_3 - ^{125}J und T_4 - ^{125}J gleichzeitig eluiert. Bei einem pH-Wert von 7,8 deutete sich wieder eine Trennung an. Allerdings wurde nun erst T_4 - ^{125}J und dann erst T_3 - ^{125}J eluiert. Bei einer weiteren Erniedrigung des pH-Wertes werden die Schilddrüsenhormone T_3 und T_4 auf der Sephadex-Säule relativ stark adsorbiert. Abb.8 zeigt, dass T_4 - ^{125}J und T_3 - ^{125}J erst durch 0,015 N NaOH eluiert werden.

Abb.7: Chromatographie von $T_3^{-125}J$ und $T_4^{-125}J$ auf 5 g Sephadex G-25 fine unter kontinuierlicher pH-Wertmessung. Wiederfinderate bei $T_3^{-125}J$ (●—●) 96 %, bei $T_4^{-125}J$ (▼—▼) 101 %.

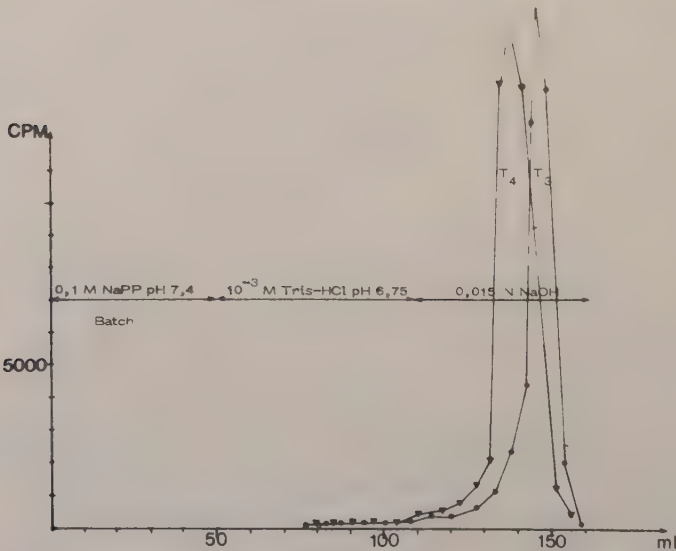
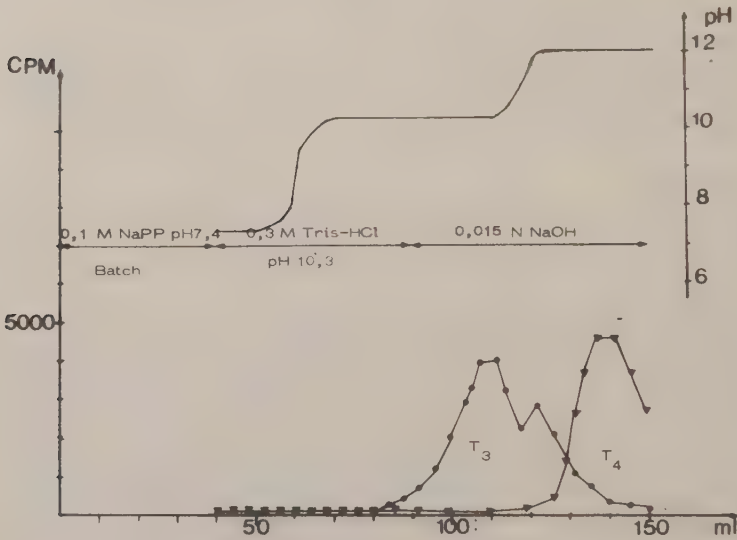


Abb.8: Chromatographie von $T_3^{-125}J$ bzw. $T_4^{-125}J$ auf 5 g Sephadex G-25 fine-Säulen. Methode und Auswertung der Ergebnisse s.Text.

2.2 Einfluss verschiedener Pufferlösungen auf die Trennung von T_3 und T_4 .

Um eine bessere Trennung von T_3 - ^{125}J und T_4 - ^{125}J als in Abb. 7 aufgezeigt ist, zu erzielen, wurden folgende Elutionsmittel geprüft:

0,3 M Tris-NaOH-Puffer pH 11,5; 0,1 M Tris-NaOH-Puffer pH 11,0; 0,1 M Natriumcarbonatlösung pH 11,0; 0,1 M Tris-NaCl-Puffer pH 10,3; 0,2 M Triäthanolhydrochlorid mit 0,2 N NaOH auf pH 10,0 gebracht; 0,1 M Ammoniumhydrogencarbonatlösung pH 7,9; 0,01 M Ammoniumacetatlösung pH 6,8 und 0,1 M Citrat-II-Puffer pH 6,0 (s. Geigy-Tabelle).

Mit all diesen Elutionsmitteln gelang es allerdings nicht, eine ausreichende Trennung von T_3 und T_4 zu erzielen. Die beste T_3/T_4 -Trennung konnte von uns seltsamerweise durch Eluieren mit Aqua bidest. erzielt werden: 5 g Sephadex G-25 wurden mit 0,015 N NaOH äquilibriert. Nach Auftragen eines Inkubationsgemisches von Serum mit T_3 - ^{125}J bzw. T_4 - ^{125}J wurde nacheinander mit 45 ml 0,3 M Tris-HCl-Puffer pH 7,4, 80 ml Aqua bidest. und 50 ml 0,015 N NaOH eluiert. Abb. 9 zeigt, dass nach Subtraktion des proteingebundenen Anteils an T_4 - bzw. T_3 - ^{125}J und des ^{125}J -Jodidanteils $90,5 \pm 5,1\%$ ($\bar{x} \pm s$, $N=8$) des wiedergefundenen T_4 - ^{125}J und $14,7 \pm 3,5\%$ ($\bar{x} \pm s$, $N=7$) T_3 - ^{125}J bei der Elution mit Aqua bidest. in einem Peak eluiert werden. Bei der anschliessenden Elution des auf der Säule adsorbierten T_3 - ^{125}J mit 0,015 N NaOH wird allerdings auch $9,5 \pm 3,0\%$ ($\bar{x} \pm s$, $N=8$) der Radioaktivität des T_4 - ^{125}J eluiert. Bei einem angenommenen Verhältnis von T_3 zu T_4 im Serum von 1:30 würde ein Anteil von 9,5 % des Gesamt- T_4 im T_3 -Peak keine Aussage über den T_3 -Gehalt einer Serumprobe zulassen. Ob es sich jedoch bei diesen 9,5 % um T_4 - ^{125}J oder aber um eine durch Dejodierung entstandene T_3 - ^{125}J -"Verunreinigung" des T_4 - ^{125}J Standards handelte, konnte von uns nicht sicher geklärt werden. Bemerkenswert ist, dass im Anschluss an einen Waschschrift mit einem sauren Tris-HCl-Puffer z.B. pH 6,95 weder T_4 - ^{125}J noch T_3 - ^{125}J mit Aqua bidest. eluiert werden. Zur Frage, ob die durch einen einfachen Aqua bidest.-Waschschrift erzielte T_3/T_4 -Trennung durch eine Änderung der Molarität oder der Wasserstoffionenkonzentration

Abb.9: Trennung von T_3 - ^{125}J (●—●) und T_4 - ^{125}J (▼—▼) im Serum auf 5 g Sephadex G-25 fine. Methodik und Ergebnisse s.Text.

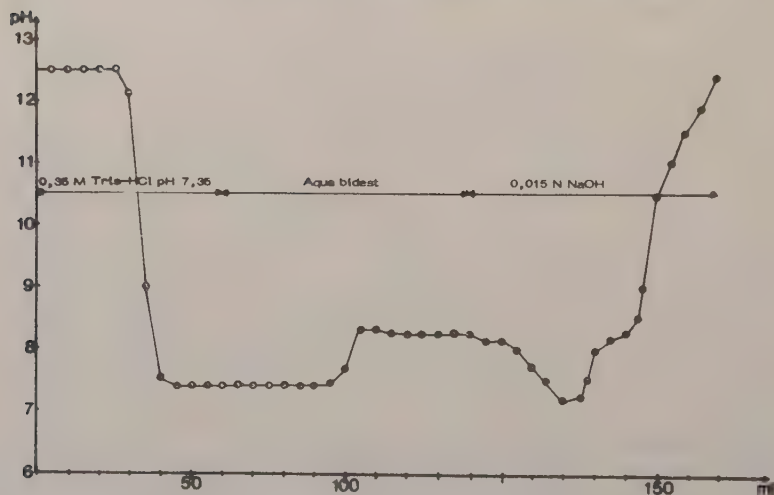
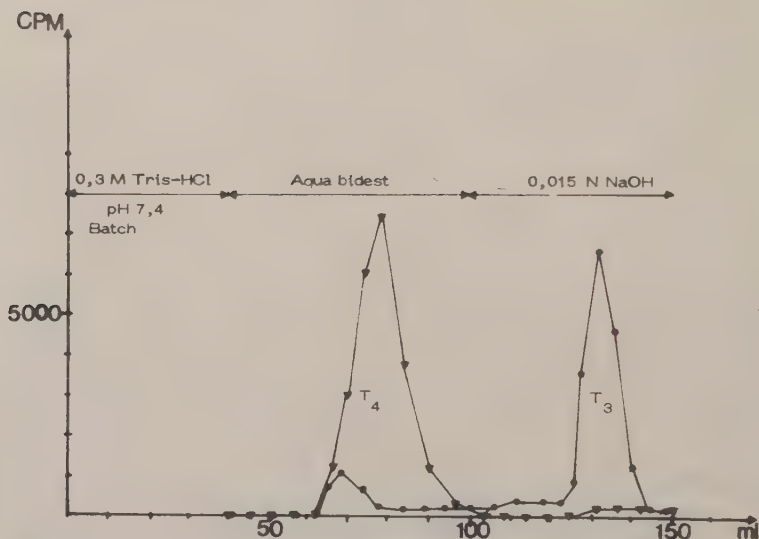


Abb.10: pH-Diagramm des Säuleneluates einer 5 g Sephadex G-25 fine-Säule bei der Trennung von T_3 - ^{125}J und T_4 - ^{125}J s. auch Abb.9

zustande kam, oder vielleicht nur durch die verschiedene Löslichkeit von T_3 und T_4 , wurde der folgende Versuch durchgeführt: 5 g Sephadex G-25 wurden mit 0,015 N NaOH äquilibriert. Nach Auftragen des Lösungsmittels, hier aber ohne T_3 - und T_4 - ^{125}J wurde mit 60 ml 0,35 M Tris-HCl-Puffer pH 7,35, 80 ml Aqua bidest und 80 ml 0,015 N NaOH eluiert. Die Wasserstoffionenkonzentration des Säuleneluates wurde mit Hilfe einer Durchflusselektrode kontinuierlich gemessen. Das gewonnene pH-Diagramm ist in Abb.10 aufgezeigt: Nach 40 ml spülen mit Elutionspuffer ist eine 5 g Sephadex G-25 fine - Säule vollständig umpuffert. Nicht sicher zu deuten war von uns die Beobachtung, dass Aqua bidest (pH-Wert bei uns ca. 5,5) im Anschluss an einen Waschschrift mit Tris-HCl-Puffer mit einem pH von 8,25 eluiert wird. Auffällig war ferner das langsame Absinken des pH-Wertes des Säuleneluates von pH 8,25 auf pH 7 beim Umschalten von der Elution mit Aqua bidest. auf 0,015 N NaOH.

3. Zusammenfassung und Diskussion der Ergebnisse.

Obwohl es aufgrund der verschiedenen Dissoziationskonstanten der phenolischen Hydroxylgruppe (nach Edelhoeh bei T_3 pK 8,45 bei T_4 pK 6,73) möglich sein sollte, die Schilddrüsenhormone Trijodthyronin und Thyroxin zu trennen, konnte von uns trotz Variation der Wasserstoffionenkonzentrationen und Ionenstärke der verschiedensten Pufferlösungen auf Dextrangel keine ausreichende Trennung erzielt werden. Ein zunächst vielversprechendes Chromatographiesystem fanden wir mit der Stufenelution von nacheinander 0,3 M Tris-HCl-Puffer pH 7,4, Aqua bidest. und 0,015 N NaOH. Bei einem Anteil von ca. 10 % des T_4 - ^{125}J -Standards in der T_3 - ^{125}J -Fraktion jedoch liesse sich keine Aussage über den Trijodthyroningehalt einer Serumprobe machen, wenn man ein Verhältnis von T_3 zu T_4 im Serum wie 1:30 zugrunde legt. Ob es sich bei diesen 10 % allerdings um T_4 - ^{125}J oder um eine " T_3 - ^{125}J -Verunreinigung", die durch Dejodierung des T_4 - ^{125}J -Standards entstand, handelte, konnte von uns nicht geklärt werden.

IV. DÜNNSCHICHTCHROMATOGRAPHISCHE TRENNUNG VON TRIJODTHYRONIN UND THYROXIN.

Die Dünnschichtchromatographie hat sich zur Trennung jodierter phenolischer Aminosäuren bewährt (3). Aufgabe unserer Untersuchungen war es nun, ein leistungsfähiges System zur T_3 -/ T_4 -Trennung zu finden, das eine quantitative Aussage über die Konzentrationen beider Schilddrüsenhormone z.B. in Serumextrakten erlaubt.

1. Technisches Vorgehen.

1.1 Beschichtung der Platten:

Wichtig ist, dass nur mit absolut jod- und fettfreien Platten gearbeitet wird. Deshalb wurden nur Glasplatten, die in Bichromat-Schwefelsäure und Aqua bidest. gespült waren, verwendet. Zur Beschichtung der "Camag"-Trägerplatten (Grösse 20 x 20 cm) wurden 18 g Kieselgel HF₂₅₄ nach Stahl der Fa. E. Merck AG, Darmstadt mit 45 ml Aqua bidest. angerührt. Mit dem Desaga-DC-Streichgerät wurden 5 Platten in einem Arbeitsgang beschichtet (Schichtdicke 0,25 mm). Anschliessend wurden die Platten über Nacht an der Luft getrocknet.

1.2 Auftragen der Substanzen:

Die aufzutragenden "kalten" Substanzen (Kaliumjodid, L-Monojodtyrosin, L-Dijodtyrosin, L-3,5,3'-Trijodthyronin, L-Thyroxin; alle Substanzen von der Fa. Fluka AG, Schweiz) wurden in 0,1 N NaOH gelöst. Die radioaktiven Substanzen T_3 -¹²⁵J und T_4 -¹²⁵J waren in 0,06 M Natriumphosphatpuffer pH 7,4 gelöst (s. II, 1.2). Von jeder Lösung wurden 2 μ l aufgetragen, was 0,25 μ g der jeweiligen Substanz entsprach. Ausserdem wurden 2 μ l eines Gemisches aufgetragen, in dem jeweils 0,25 μ g MIT, DIT, T_3 , T_4 und Jodid gelöst waren. Mit einer Mikropipette wurden 1,5 cm vom unteren Plattenrand die Lösungen aufgetragen. Der Abstand der einzelnen Flecke betrug untereinander 2 cm, der vom Plattenrand 3 cm.

1.3 Entwickeln der Platten:

Nach dem Abdampfen des Lösungsmittels der aufgetragenen Substanzen (ca. 30 min) wurden die Platten in die vollständig

mit Filterpapier ausgekleideten Entwicklungskammern der Fa. Desaga (Grösse 21 x 21 x 5 cm) gebracht. Diese wurden vorher mit 100 ml des Fliessmittels gefüllt und mindestens 20 min stehen gelassen, um eine vollständige Kammersättigung zu erreichen. Anschliessend wurden bis zu vier Platten in die Kammer eingebracht, wobei die Platten ca. 0,4 cm in das Laufmittel eintauchten. Wichtig ist, dass die Kammern vollkommen dicht verschlossen sind und während der Laufzeit nicht geöffnet werden. Das Entwickeln der Platten wurde bei möglichst konstanter Temperatur und diffusem Licht vorgenommen. Wenn die Fliessmittelfront ca. 17 cm gewandert war, wurde die Platte der Kammer entnommen und an der Luft getrocknet.

1.4 Chemischer Nachweis der "kalten" Substanzen:

Um die jodhaltigen Substanzen auf den Platten sichtbar zu machen, wurden die Platten nach vollständiger Trocknung mit folgenden Lösungen besprüht:

a) Cer-IV-sulfatlösung: 10 g Cer-IV-sulfat wurden in 100 ml 1 N H_2SO_4 eingebracht, die zuvor auf 0 bis 5°C abgekühlt worden war. Nach einer Stunde wurde das Gemisch filtriert und bis zum Gebrauch kalt aufbewahrt.

b) Natriumarsenitlösung: 5 g Arsentrifoxyd wurden in 30 ml 1 N NaOH gelöst. Die Lösung wurde tropfenweise in 65 ml auf 0 bis 5°C abgekühlte 2 N H_2SO_4 eingerührt. Anschliessend wurde mit Aqua bidest. ad 100 ml aufgefüllt.

Vor Gebrauch wurden gleiche Volumina der Lösungen a) und b) gemischt und mit Hilfe eines feinen Zerstäubers auf die Platten gesprüht. Um einen besseren Kontrast zu erhalten, wurden die Chromatogramme mit einer 1 %igen Lösung von o-Phenylendiamin in Aceton besprüht; die weissen Flecken an den Stellen jodhaltiger Verbindungen heben sich von dem sonst braun gefärbten Chromatogramm deutlich ab.

1.5 Messung radioaktiver Substanzen:

Da ein Scanner zur Auswertung radioaktiver Chromatogramme uns nicht zur Verfügung stand, musste das Kieselgel quantitativ in kleinen Fraktionen von den Trägerplatten gewonnen werden. Hierzu wurde von uns ein "Mikro-Staubsauger" (Abb.11)

Abb.11: "Mikrostaubsauger" zur fraktionierten, quantitativen Gewinnung des Kieselgels von der Trägerplatte. Methodik s.Text.

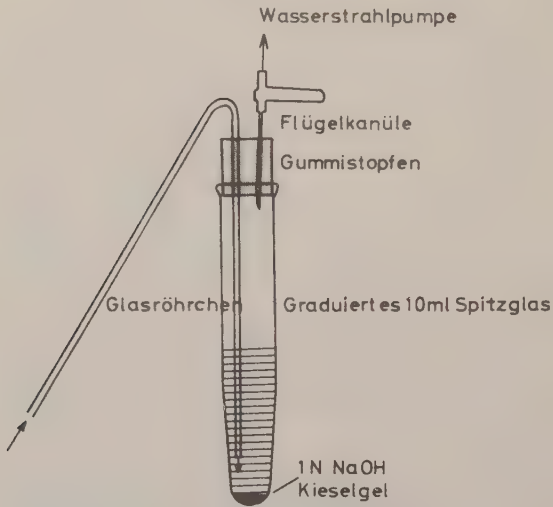


Abb.12: Schematische Darstellung der Präparation der Trägerplatte zum fraktionierten quantitativen Absaugen des Kieselgels.

entwickelt. Durch Unterdruck, der mit einer Wasserstrahlpumpe erzeugt wird, wird durch ein Glasröhrchen das Kieselgel angesaugt. In 1 N NaOH werden Jodid und die Jodaminsäuren aus dem Kieselgel extrahiert, dieses setzt sich aufgrund seines spezifischen Gewichtes und seiner Unlöslichkeit am Boden eines graduierten Zentrifugenglases ab. Die Radioaktivität der einzelnen Fraktionen konnte dann am automatischen Gammamessplatz gemessen werden. Vorher mussten die Platten mit Hilfe eines Lineals und eines Spatels senkrecht zur Laufrichtung Linien in das Kieselgel gekratzt werden, wodurch die aufgetragenen Substanzen voneinander abgetrennt wurden. Zusätzlich wurden parallel zur Laufrichtung entweder in 0,5 cm Abständen Linien gezogen, oder korrespondierend zu den chemisch nachgewiesenen "kalten" Vergleichssubstanzen am linken und rechten Plattenrand (Abb.12).

1.6 Auswertung:

Die Güte der chromatographischen Auftrennung der verschiedenen Substanzen wird durch deren Rf-Werte charakterisiert, d.h. durch das Verhältnis der von den Substanzen zurückgelegten Strecke zur zurückgelegten Strecke der Fließmittelfront. Angegeben werden hier die mit dem Faktor 100 multiplizierten Rf-Werte (hRf). Gemessen wurde jeweils vom Auftragspunkt bis zum Mittelpunkt des nachgewiesenen Substanzflecks. Nur wenn scharf voneinander abgegrenzte Flecken nachgewiesen wurden, konnte eine ausreichende Trennung angenommen werden.

1.7 Fehlerquellen:

Die Grösse der Rf-Werte wird von mehreren Faktoren beeinflusst:

1.7.1 Menge der aufgetragenen Substanz:

Ist die Menge der aufgetragenen Substanz zu gross, stellt sich kein echtes Adsorptions- bzw. Verteilungsgleichgewicht ein, die Flecken werden gross und unscharf.

1.7.2 Laufgeschwindigkeit:

1.7.2.1 Temperaturänderungen bedingen eine Änderung der Laufgeschwindigkeit. Aus kürzerer Chromatographiedauer wird eine

schlechtere Trennung.

1.7.2.2 Mit zunehmender Länge des Chromatogramms nimmt die Aufsteigegeschwindigkeit des Fliessmittels und damit die der Substanzen ab. Es ergibt sich eine Verzerrung der Rf-Werte.

1.7.2.3 Die manuelle Beschichtung der Platten bedingt Schwankungen der Schichtdicke und damit der Laufgeschwindigkeit.

1.7.2.4 Der Trocknungsgrad der Platten war nicht immer konstant zu halten.

1.7.2.5 Ist die Kammersättigung nicht vollständig, wandert die Fliessmittelfront am Rande der Platte schneller als in der Mitte.

2. Ergebnisse der dünnschichtchromatographischen Trennung von T_3 und T_4 .

2.1 Auftrennung "kalter" Standards:

Abb.13 zeigt ein typisches Chromatogramm nach dem Besprühen mit Cer-IV-sulfat-Natriumarsenitlösung und o-Phenylendiamin (s.o.). Die Ergebnisse einer gelungenen dünnschichtchromatographischen Auftrennung von T_3 und T_4 bei verschiedenen Laufmitteln sind in Tab.1 aufgezeigt.



Tab.2: Übersicht über DC-Chromatographie von Jodaminosäuren und Jodid. Methodik s.Text. hRf-Werte von inaktivem MIT, DIT, T₂, T₃, T₄ und KJ.

Laufmittel	Substanz	hRf	N	Bemerkungen
n-Butanol:	MIT	9,4	2	scharfe Abtrennung
Äthylmethyleketon:	T ₄	15,6	2	der einzelnen Flek-
2 N NH ₃	T ₃	21,8	2	ke voneinander
	KJ	63,9	2	
7,5 : 3 : 1,5				
	T ₄	40,6	2	T ₃ und T ₄ nicht aus-
	T ₃	44,4	2	reichend voneinander
	KJ	71,8	2	getrennt
6 : 2,8 : 1,2				
n-Butanol:	MIT	3,8	2	scharfe, sehr eng
Hexan: 2 N NH ₃	T ₄	7,4	2	liegende Flecken
	T ₃	11,1	2	
	KJ	40,5	2	
7 : 2 : 1				
Butanol:	T ₄	29,2	1	Flecken nicht sehr
iso-Propanol:	T ₃	33,8	1	scharf abgegrenzt
2 N NH ₃	KJ	50,0	1	
60 : 20 : 20				
	T ₄	20,0	1	
	T ₃	26,0	1	
	KJ	55,0	1	
60 : 30 : 10				
	T ₄	3,0	1	keine ausreichende
	T ₃	5,2	1	Trennung von T ₃ , T ₄
	KJ	6,4	1	und J ⁻
70 : 25 : 5				

	T ₄	17,8	4	Trennung gut, Flek-
	T ₃	25,6	4	ken verhältnismässig
	KJ	53,5	4	gross.
70 : 20 : 10				
	T ₄	18,5	4	Flecken zu eng
	T ₃	23,3	4	
	KJ	53,5	4	
80 : 10 : 10				
n-Butanol:	T ₄	12,3	5	Trennung gut, aller-
iso-Propanol:				dings sind die Flek-
2N NH ₃	T ₃	17,4	5	ken verglichen mit
Iso-Oktan	KJ	44,3	5	s nicht weit genug
60 : 20 : 10 : 10				getrennt
n-Butanol:	T ₄	14,9	5	Trennung sehr
iso-Propanol:				schlecht reproduzier
2 N NH ₃	T ₃	21,0	5	bar
iso-Oktan	KJ	52,1	5	
40 : 40 : 10 : 10				
n-Butanol:	T ₄	20,7	5	Trennung und Repro-
iso-Propanol:				duzierbarkeit gut.
2 N NH ₃	T ₃	28,1	5	
Hexan	KJ	52,9	5	
40 : 40 : 10 : 10				
n-Butanol:	T ₄	16,5	2	
iso-Propanol:				
2 N NH ₃	T ₃	22,3	2	
iso-Oktan	KJ	50,0	2	
30 : 50 : 10 : 10				

n-Butanol:	T ₄	32,1	1
iso-Propanol:			
2 N NH ₃	T ₃	35,7	1
Hexan	KJ	58,5	1
30 : 40 : 15 : 15			

	T ₄	39,2	1
	T ₃	42,8	1
	KJ	52,0	1
30 : 40 : 20 : 10			

	T ₄	18,0	1
	T ₃	23,3	1
	KJ	26,6	1
30 : 30 : 20 : 20			

	T ₄	30,0	1
	T ₃	34,6	1
	KJ	45,3	1
40 : 30 : 20 : 10			

	T ₄	27,5	1
	T ₃	32,5	1
	KJ	43,7	1
40 : 40 : 20 : 10			

	T ₄	15,0	1
	T ₃	20,7	1
	KJ	53,5	1
55 : 30 : 10 : 5			

	T ₄	24,4	1
	T ₃	28,7	1
	KJ	56,2	1
60 : 20 : 15 : 5			

T ₄	11,9	1	Flecken sehr scharf
T ₃	17,5	1	aber zu eng beieinan
KJ	38,0	1	der

70 : 10 : 10 : 10

n-Butanol:	T ₄	24,1	1
iso-Propanol:			
2 N NH ₃ :	T ₃	28,3	1
Hexan: H ₂ O	KJ	34,4	1
20 : 30 : 15 : 15 : 20			

T ₄	21,2	3
T ₃	24,7	3
KJ	48,6	3

60 : 20 : 10 : 10 : 10

T ₄	35,7	1
T ₃	39,2	1
KJ	48,5	1

30 : 40 : 10 : 10 : 10

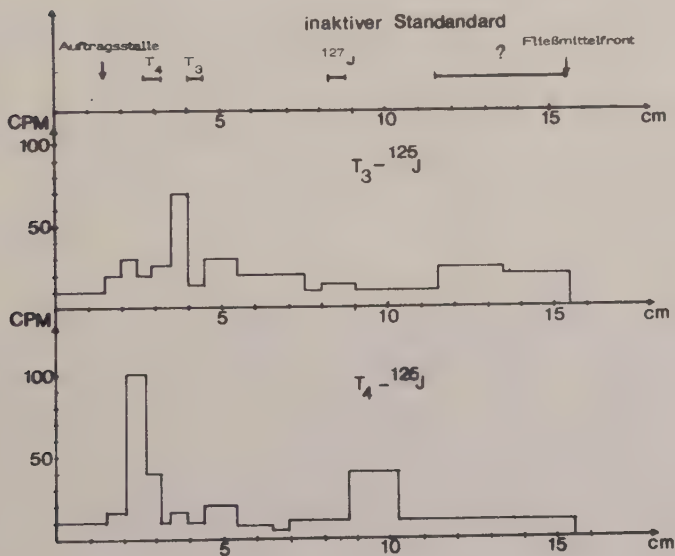
n-Butanol:	T ₄	13,8	12	gute Trennung
iso-Propanol:				
2 N NH ₃ :	T ₃	20,0	12	
Hexan	KJ	48,4	12	
60 : 20 : 10 : 10				

n-Butanol:	T ₄	14,6	7	gute Trennung
iso-Propanol:Hexan:	T ₃	20,8	7	
2 N NH ₃ mit PTU	KJ	49,0	7	

2.2 Auftrennung radioaktiver Standards:

Bei der Messung der radioaktiven Dünnschichtchromatogramme fanden sich nur $27,0\% \pm 10,6\%$ der Gesamtaktivität des T_3 - ^{125}J bzw. $31,7\% \pm 20,8\%$ der Gesamtaktivität des T_4 - ^{125}J in den jeweiligen durch "kalte" Vergleichssubstanzen chemisch ermittelten T_3 - bzw. T_4 -Peaks. Der Rest der Aktivität war über die ganze Platte verteilt und keinen Vergleichssubstanzen wie z.B. MIT, DIT oder Jodid zuzuordnen (Abb.14). Wegen der schlechten Reproduzierbarkeit und Standardisierbarkeit der Ergebnisse bei der dünnschichtchromatographischen Trennung der Schilddrüsenhormone wurde von weiteren Versuchen Abstand genommen.

Abb.14: Radio-Dünnschichtchromatogramm von T_3 - ^{125}J und T_4 - ^{125}J . Methodik s.Text. Fließmittel: n-Butanol: iso-Propanol:2 N NH_3 :iso-Oktan 60:20:10:10.



3. Zusammenfassung und Diskussion der Ergebnisse der dünn- schichtchromatographischen Trennung der Schilddrüsenhormone:

Mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie war es zwar möglich, Trijodthyronin und Thyroxin chemisch qualitativ voneinander zu trennen. Die Aussichten auf eine suffiziente, quantitative Bestimmung von T_3 und T_4 z.B. in Gewebe- oder Serumextrakten waren jedoch nach den Ergebnissen mit radioaktiven Tracern wenig erfolgversprechend. Bei T_3 - ^{125}J ergab sich lediglich eine Wiederfinderate von $27 \pm 10,6 \%$, bei T_4 - ^{125}J von $30,7 \pm 20,8 \%$ in den entsprechenden, chemisch ermittelten Peaks. Ob diese wenig befriedigenden Ergebnisse von einer nicht ausreichenden Standardisierung unseres chromatographischen Systems herrühren, oder ob während der Chromatographie vielleicht zwangsläufig an den aktiven Oberflächen des Adsorbens eine beträchtliche chemische Zersetzung der Jodaminosäuren auftritt, konnte von uns nicht geklärt werden.

V. ZUSAMMENFASSUNG

1. Nur bei 40 % der erhöht gefundenen $PB^{127}I$ -Werte handelte es sich klinisch um eine Hyperthyreose (1). Die restlichen 60 % waren durch vorherige Verabreichung von organische Jodverbindungen enthaltende Medikamente und Röntgenkontrastmittel bedingt. Durch Chromatographie über Dextrangel wurde von uns versucht, in diesen Seren nach Abtrennung der "Jodverseuchung" eine quantitative, chemische Hormonjodbestimmung durchzuführen. Bei einem vielfachen bis zu 10^4 -fachen Überschuss an z.B. Biligrafin forte gegenüber den Schilddrüsenhormonen konnte auf Dextrangel keine ausreichende Abtrennung erzielt werden.

2. Das Verhältnis von Trijodthyronin zu Thyroxin im Serum dürfte normalerweise bei 1:30 liegen. Trijodthyronin hat aber eine 5-10 fach stärkere biologische Wirksamkeit als Thyroxin. Aufgrund der verschiedenen Dissoziationskonstanten der phenolischen Hydroxylgruppe sollten die beiden Schilddrüsenhormone auf Dextrangel getrennt und quantitativ bestimmt werden. Bei der erzielten Trennung wurden jedoch bei uns ca. 10 % des $T_4^{125}J$ im $T_3^{125}J$ -Peak gefunden, was keine quantitative Aussage über den T_3 -Gehalt z.B. in Serumproben erlauben würde. Ob es sich hierbei allerdings um zu $T_3^{125}J$ dejodiertes $T_4^{125}J$ handelte, konnte nicht sicher geklärt werden.

3. Schliesslich versuchten wir, Trijodthyronin und Thyroxin mit Hilfe dünnschichtchromatographischer Verfahren zu trennen. Chemisch konnten mit verschiedenen Fließmittelsystemen qualitativ ausreichende Trennungen erzielt werden. Bei der Chromatographie radioaktiver Standards von $T_3^{125}J$ und $T_4^{125}J$ fand sich in den chemisch ermittelten, zugehörigen Area- len jedoch nur eine Wiederfinderate von ca. 30 %.

VI. LITERATURVERZEICHNIS:

1. ZACH, O.: Zur Dextrangelchromatographie von Schilddrüsenhormonen.
Dissertation, München, 1970
2. SCRIBA, P.C.: Schilddrüsenkrankheiten.
In: K. SCHWARZ und P.C. SCRIBA: Endokrinologie für die Praxis, Lehmann, München, 1970.
3. HORN, K.: Zur klinischen Bedeutung der Bestimmung der Serumproteinbindung von Schilddrüsenhormonen.
Dissertation, München, 1967
4. JONES, J.E., J. SHULZ:
Determination of the thyroxine iodine content of serum contaminated by organic iodines. A method based on gel-filtration.
J.clin.Endocr. 27, 877 (1967)
5. JONES, J.E., J. S. SHULTZ:
Identification of thyroidal iodamino acids by gel filtration and automated ¹²⁷I-determination.
J.clin.Endocr. 26, 975 (1966)
6. KÖDDING, R., H. L. KRÜSKEMPER:
Bestimmung von nicht radioaktiv markierten Schilddrüsenhormonen und Jodtyrosinen neben jodhaltigen Röntgenkontrastmitteln im Serum
Klin.Wschr. 46, 143 (1968)

Lebenslauf

Am 30.11.1944 wurde ich als Sohn des Hoteldirektors Paul von Pattay und seiner Frau Rita, geb.Aichinger, in Kitzbühel geboren.

Die Volksschule besuchte ich von 1950-1954 in Kitzbühel. Von 1954-1959 besuchte ich die Privatrealschule Weihs in St.Johann i.T. 1959 übersiedelte ich nach München, wo ich in die Luitpold-Oberrealschule eintrat. Dort legte ich 1965 mein Abitur ab.

Das Medizinstudium begann ich 1965 in München, wo ich 1966 das Vorphysikum und 1968 das Physikum bestand.

Im Wintersemester 1971 legte ich das Staatsexamen ab.

